

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-82299

(43)公開日 平成7年(1995)3月28日

(51)Int.Cl.⁶

C 07 K 14/78

A 23 J 3/06

3/34

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

8318-4H

A 61 K 37/18

A 61 L 15/01

審査請求 未請求 請求項の数5 FD (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平5-249872

(22)出願日

平成5年(1993)9月10日

(71)出願人 391024353

宮城化学工業株式会社

宮城県仙台市若林区若林2丁目7番1号

(72)発明者 酒井 康夫

仙台市宮城野区東宮城野4-2-611

(74)代理人 弁理士 大津 洋夫

(54)【発明の名称】 ペプチド組成物とその製造法

(57)【要約】

【目的】アレルギー患者向けの食品のタンパク質源、あるいは外傷性疾患や外科的治療を受けている患者の輸液製剤成分のひとつとして有用なペプチド組成物で、コラーゲンあるいはゼラチンの特性を保持しつつ、抗原性の認めない分子量の小さいペプチド組成物とその製造法を提供する。

【構成】コラーゲン成分あるいはその変性体であるゼラチン成分を含む原材料を細菌性のコラゲナーゼ酵素で特異的に分解することによって、分子量1,000以下で抗原性がなく、アミノ酸配列が(Gly-X-Y)n: n=1~3であるペプチドが70%以上含有するようペプチド組成物を構成した。

 PTO 2003-1172
 S.T.I.C. Translations Branch

(2)

特開平7-82299

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コラーゲン成分あるいはゼラチン成分を含有する原材料をコラゲナーゼ酵素を用いて特異的に分解することによって得られる、分子量が1,000以下で、抗原性がなく、アミノ酸配列が(G1y-X-Y)n: n=1~3であるペプチドが70%以上含有することを特徴とするペプチド組成物。

【請求項2】 分解に用いるコラゲナーゼ酵素が粒径10μm以下の磁性担体に結合していることを特徴とする請求項1記載のペプチド組成物。

【請求項3】 化学結合法によってコラゲナーゼ酵素を結合させた担体を用いて酵素分解を行うことを特徴とする請求項1記載のペプチド組成物。

【請求項4】 出発原材料である動物由来の乾燥骨あるいは生骨を碎骨し、この碎骨材料を酸処理した後、酵素処理に適する大きさに細断あるいは破碎し、基質特異性を有するコラゲナーゼ酵素により酵素分解するようにしたことを特徴とするペプチド組成物の製造法。

【請求項5】 ペプチド組成物の製造法において、酸処理後に脱毛処理や油脂除去処理を行うと共に、細断あるいは破碎した後にアルカリ処理したり、プロテアーゼで前処理するようにしたことを特徴とする請求項4記載のペプチド組成物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コラーゲン成分を多く含む動物結合組織を処理したもの、または、これらからある程度精製したコラーゲンあるいは変性コラーゲン(ゼラチン)などを原材料として、コラゲナーゼ酵素で選択的に加水分解することによって得られる、抗原性のない分子量が1,000以下のペプチド組成物と、その製造方法に関する。

【0002】 従来より、コラーゲンないしは変性コラーゲン(ゼラチン)が有する性質により、各種の産業分野・領域における素材として利用されている。例えば、良質の凝固性タンパク質ということによる各種食用ゼリー素材をはじめとして、その保護コロイド性を利用した写真印画紙用材料あるいは医薬用カプセル素材などとして活用されてきた。また、最近は、免疫反応を誘発しにくいという性質に注目した創傷治療剤や人工血管用の素材などへの応用も試みられている。

【0003】 しかし、このような性質を有する反面、コラーゲンは粘性が高く、またその変性体であるゼラチンは凝固しやすいなどの性質が有るため、その用途が限定されてしまう傾向にある。そこで、保湿性が高いという本来の性質を活用し、酸処理や化学修飾を施して水溶性を付与させることで、一部、化粧品の成分材料として供給されたり、また、プロテアーゼやアルカリーゼによって部分加水分解された低分子コラーゲンなども商品化されている。本来、コラーゲン分子やゼラチン分子は、そのア

ミノ酸および立体構造上、他のタンパク質と大きく異なる性質をもっている。本発明は、こうしたコラーゲン成分やゼラチン成分のもつている特徴・特性を生かしつつ、これまで用途が制約されていた性質を克服させて新たな機能性材料・素材としての用途開発を目指して鋭意研究を重ねて完成した。

【0004】

【従来の技術】 近年、牛乳・卵白・大豆・米・小麦などの5大アレルゲンをはじめとした各種食品に対するアレルギーの患者が急増しており、これらアレルギー患者に対する治療と予防、特に、代替え食品あるいはアレルゲン性のない食品の開発が求められてきている。このような状況の下、乳製品メーカー各社は牛乳アレルギーの乳幼児向けに、乳清タンパク質、カゼインあるいはラクトグロブリンなどの乳成分を酵素的に分解処理し低分子化させた低アレルゲン性乳製品を供給している。また、他の業界においても、米アレルギーの患者に対してやはり酵素処理を行った低アレルゲン米を製造し、治療や栄養補給などに活用している。

【0005】 しかし、原材料として使用している素材がもともと原因アレルゲンであり、その原因アレルゲンである成分が未分解のまま混入していることがある。また、分解の程度が不十分なためアレルゲン性が完全には消失されていない等の原因によりどの食物アレルギー患者にも充分な有効性を発揮しているとは言い難い状況となっている。その点、本来が抗原性の大変少ないコラーゲン成分ないしは変性コラーゲン(ゼラチン)成分ないしはこれを含有する動物組織を原材料として使用し、更に適当な処理を行って超低分子化し、アレルゲン性・抗原性をなくした素材が開発されると、各種の食物アレルギー患者に適用できる優れた治療/健康用食品あるいは栄養源としての可能性が期待される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 近年、牛乳アレルギー患者向けとして、前記のような牛乳成分の酵素分解物を原料として用いるのではなく、合成アミノ酸を添加させた育児用ミルクなどが開発されている。しかし、遊離アミノ酸は腸管における浸透圧を高め、輸送系の負担を引き起こして栄養効率を低下させるなどの欠点があった。その点、低分子量化したペプチドは、腸管吸収の面からも優れ、蛋白質栄養源として極めて有効であることが明らかになっている。従って、消化吸収、栄養生理および免疫学的反応性などの面から、「遊離アミノ酸が少なく、分子量が既定され、かつ抗原性がないペプチド」が求められており、この点からも本発明の目的とするところのペプチド組成物は有用性が高いといえる。

【0007】 一方、動物結合組織から精製されたコラーゲン成分やゼラチン成分は、最近その抗原性の低さに注目し、これを素材とした人工血管や創傷カバー材としての開発が進みつつあり、この方面的研究は今後さらに進

50

(3)

特開平7-82299

3

展すると期待されている。本発明によるところのペプチド組成物は、結合組織を形成しているコラーゲンの特徴的なアミノ酸配列を保持していることから、将来、このような方面、特に骨折治療補助剤や外科的手術の創傷早期治療剤としても活用される可能性がある。従って、本発明によるところの抗原性を無くした「コラーゲンのアミノ酸組成の特性を有した分子量の小さいペプチド組成物」は産業的有用性はますます高まってくると考えられる。

【0008】ところが、従来、乳成分やカゼイン、大豆あるいは米などのタンパク質成分を加水分解し、低分子化する場合に用いられていた酵素類は、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、パンクリアチニあるいはアクチナーゼ（特開昭62-171644号公報、特開平2-182155号公報、特開平2-167040号公報）などであり、未変性のコラーゲンに対してはほとんど作用しないため、本発明の目的である抗原性の有しない超低分子量のコラーゲン分解物の製造には適さない。また、動物組織より抽出・精製した変性コラーゲン（ゼラチン）に関しては、これらの酵素は有る程度作用するものの、抗原性が完全に消失すると考えられる一定分子量以下までは分解しない。事実、たとえば中性プロテアーゼ（プロナーゼ）やアルカリ性プロテアーゼ（アルカラーゼ）などでは平均分子量が約7,000～8,000以下のものを調製することは困難であった。

【0009】細菌由来のコラーゲン酵素は、精製されたコラーゲンや変性コラーゲン（ゼラチン）を分解する酵素としてよく知られてはいるが、コラーゲン成分ないしはゼラチン成分を含有する動物結合組織などの原材料を用いて、直接かつ特異的に、これら結合組織中のコラーゲン成分ないしは変性コラーゲン（ゼラチン）成分をコラーゲン分子本来のアミノ酸配列を保持したままで分解し、そして分子量が1,000以下で抗原性がないペプチド組成物を得る製造技術は開示されていなかった。

【0010】本発明者らは、前記のような実情に鑑みて、食物アレルギーの予防や治療、並びに骨治療・骨代謝改善あるいは外科手術時の創傷治療などに有効である素材を提供すべく、コラーゲン本来の特徴的なアミノ酸配列である $(Gly-X-Y)_n$ を保持しつつ、抗原性のない低分子量のペプチド組成物を開発するために鋭意研究を行い、本発明を完成した。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記のような課題を解消するために次のような手段を講じたものである。特許を受けようとする第1の発明は、コラーゲン成分あるいはゼラチン成分を含有する原材料をコラーゲナーゼ酵素を用いて特異的に分解することによって得られる、分子量が1,000以下で、抗原性がなく、アミノ酸配列が $(Gly-X-Y)_n$ ； $n=1\sim 3$ であるペプチドが70%

以上含有することを特徴とするペプチド組成物である。

【0012】本発明によれば、コラーゲナーゼ酵素を単離しないしは各種の担体に固定化させた状態で、コラーゲン成分ないしはゼラチン成分を含む原材料に直接作用させ、特異的な酵素分解を行わせることで、コラーゲン本来の特徴的なアミノ酸配列である $(Gly-X-Y)_n$ を保持した、抗原性のないペプチド組成物が高収率で得られる。

【0013】特許を受けようとする第2の発明は、上記

10 第1の発明における分解に用いるコラーゲナーゼ酵素が粒径 $10\mu m$ 以下の磁性担体に結合していることを特徴とするペプチド組成物である。

【0014】特許を受けようとする第3の発明は、前記第1の発明における化学結合法によってコラーゲナーゼ酵素を結合させた担体を用いて酵素分解を行うことを特徴とするペプチド組成物である。

【0015】特許を受けようとする第4の発明は、ペプチド組成物の製造法に関する発明で、出発原材料である動物由来の乾燥骨あるいは生骨を碎骨し、この碎骨材料20 を酸処理した後、酵素処理に適する大きさに細断あるいは破碎し、基質特異性を有するコラーゲナーゼ酵素により酵素分解するようにしたことを特徴とするペプチド組成物の製造法である。

【0016】本発明によるところの出発原材料としては、牛骨や豚の胸骨をはじめとした動物由来の乾燥骨あるいは生骨を碎いた後、酸処理などによって灰分を除去したオセイン、牛皮や豚皮などの動物性皮原料あるいはこれらから脱毛処理や油脂層除去処理を行ったもの、あるいは牛や豚をはじめとした動物性の腱や軟骨などを酵素処理に適する大きさに細断あるいは適当な方法で破碎したものなどをそのまま使用する。

【0017】本発明における酵素分解に用いるコラーゲナーゼ酵素は、*Clostridium histolyticum*, *Streptomyces parvulus*などの細菌、放線菌あるいは真菌など由来で、コラーゲン特有のアミノ酸配列： $(Gly-X-Y)_n$ のグリシンのアミノ基側を特異的に切断する酵素を用いる。また、これらの酵素遺伝子を遺伝子工学的に特定のベクターに組み込んで、乳酸菌や酵母などの他の菌体あるいは動物に産生させて得られた遺伝子組み替えによる酵素で、類似の基質特異性を有するコラーゲナーゼ酵素であっても問題はない。

【0018】特許を受けようとする第5の発明は、上記のペプチド組成物の製造法において、酵素処理後に脱毛処理や油脂層除去処理を行うと共に、細断あるいは破碎した後にアルカリ処理したり、プロテアーゼで前処理するようにしたことを特徴とするペプチド組成物の製造法である。

【0019】この方法によれば、この方法により次工程のコラーゲナーゼ酵素による分解を容易にさせることが可能となる。即ち、次工程のコラーゲナーゼ酵素による分解

(4)

特開平7-82299

5

を容易にさせるため、これらの原料をさらに消石灰等でアルカリ処理したり、場合によってはペプシン、トリプシン、パバインなどのコラゲナーゼ以外のアロテアーゼで前処理して使用しても良い。更にはコスト的に不利はあるが、このような原料からもう一段抽出・精製工程を経て得られたコラーゲンないしはゼラチンを用いても良い。その際ににおける精製度合いは、使用するコラゲナーゼ酵素の純度や特異性にも関係するが、本発明においては特に問わない。むしろ、これら出発原材料の選択基準は製造工程や本発明によるところのペプチド組成物の用途と関係が重要であり、それに合わせて適宜選択する必要があると言える。

【0020】本発明におけるコラゲナーゼ酵素を使用する際に特に留意すべき点は、コラゲナーゼ酵素の純度である。通常、各種酵母から調製されたコラゲナーゼ酵素には、他の蛋白質分解酵素（アロテアーゼ）が混入していることがある。この不純酵素が多く含まれると原材料中のコラーゲン成分以外のタンパク質も分解されてしまうため、最終製品であるペプチド組成物の品質が低下してしまう原因となる。従って、使用するコラゲナーゼ酵素の純度は、その基質特異性と共に、十分注意を払う必要がある。

【0021】但し、同じ酵素名ではあるが、牛、豚、マウス、ヒトなどの動物由来のコラゲナーゼ酵素ないしはこれらのコラゲナーゼ酵素遺伝子を放線菌、大腸菌、酵母などに導入させて作成したコラゲナーゼ酵素で、前記のような基質特異性を有せず、未変性のコラーゲンに作用し大きな断片を生じせしめるようなコラゲナーゼ酵素は含まれない。

【0022】コラゲナーゼ酵素による酵素分解の方法には（a）バッチ法、（b）カラム法あるいは（c）これらを組み合わせた方法などがある。また、この両者における製造ラインと使用するコラゲナーゼ酵素の形態との組み合わせはいろいろな方式を採用することが可能である。たとえば、前者のバッチ法の場合、コラゲナーゼ酵素を単独で用いたり、回収を容易にするためコラゲナーゼ酵素を種々の担体や磁性化した粒子あるいは金属性粒子担体などに結合させて用いたりできる。また、原材料・コラゲナーゼ酵素と分解産物との分離については、酵素分解が終了した後ないしは分解過程全体を通じて、両者の分子量差を利用して分離する方式を用いることができる。特に、限外済過膜などの分離膜を備えた装置をバッチ法の製造システムに組み込むことによって、酵素分解で生じた分解産物をその都度あるいは常時酵素反応系外へ排除する方式は、分解産物による酵素反応のフィードバックを掛かりにくくすることができる為大変有効な手段であると言える。

【0023】また、後者のカラム法の場合、コラゲナーゼ酵素を物理吸着法あるいは化学結合法によって各種の担体に結合させ、クロマト用のカラムに充填した通常の

システムを用いることができる。しかし、このカラム法によって本発明によるところのペプチド組成物をより効率的に製造するためには、いくつかの工夫を加えた方が良い場合がある。例えば、コラゲナーゼ酵素による分解の過程で生じてくるジペプチドあるいは若干のアミノ酸などのため、反応液のpHが酵素の至適pHより大きく外れてしまうことがある。また、コラゲナーゼ酵素の基質親和性との関係もあるが、バッチ法の場合と同様に、酵素反応の過程で生じる分解産物が酵素反応をフィードバック阻害することがある。これらへの対策として、製造装置を多連式のカラムにして、各カラムの間にpHのモニターと至適pHの維持が行える装置ないしはフローシステムによる分解産物の除去装置などを組み込む必要が生じてくる場合もある。

【0024】カラム法で使用するコラゲナーゼ酵素を固定化する担体としては、本発明に関係する業者なら知っている、一般的な市販のカラムクロマト用各種充填剤、予め活性化されてあるカラムクロマト用充填剤あるいは種々の化学合成樹脂剤で作成した各種担体などがある。

20 また、前述（a）のバッチ法で使用する磁性化粒子としては、磁性粒子を合成樹脂などで被覆したもの、金属コロイドと合成ポリマーの複合体および金属粒子あるいは細胞内にマグネタイトを有した磁性細胞などが活用できる。通常、各種担体への酵素の固定化方法に関しては、固定化させた酵素の脱着や保存安定性の面を考慮した化学結合による固定化の方が有利であるといえる。

【0025】なお、バッチ法とカラム法の他に、この両者を組み合わせた方法も採用できる。たとえば、まずバッチ法で中間段階まで酵素分解させた中間製品を次のカラム法の工程で最終製品まで仕上げる、等の方法が行われる。これら酵素分解の方式の選択については、生産量、工程（品質）管理、最終製品の用途あるいは前述の出発原材料との関係で適宜選択する必要がある。

【0026】酵素分解時の、出発原材料とコラゲナーゼ酵素の割合は原材料の形態やコラゲナーゼ酵素の活性との関係で変化する。たとえば、出発原材料が石灰処理されたオセインをバッチ法とカラム法を組み合わせて処理する場合は、原材料に対してバッチ法では概ね重量比で1～10%のコラゲナーゼ酵素を必要とする。但し、コラゲナーゼ酵素の再利用を図った場合には、酵素の必要量を半分以下に抑えることが可能であるが、もちろん、それは酵素反応時間や酵素活性との関係で変化する。

40 【0027】次に、本発明で得られたペプチド組成物の抗原性を検定する方法について概略を説明する。

（1）抗血清の調製（IgGタイプ抗体）

本発明によって得られたペプチド組成物100mgを10mLのPBSに溶解（10mg/mL）後、0.22μmのフィルターで沪過滅菌を行った溶液1mLをPBSで50倍希釈（200μg/mL）し、フロイント完全アジュvantと等量づつ混和してエマルジョンを調製し、7匹の

(5)

特開平7-82299

7

マウス腹腔内にその0.2mlずつ注射した。その2週間後、同じペプチド組成物の溶液を等量のフロント不完全アジュバントと共にエマルジョンを作成し、同様にマウスの腹腔内に注射し、1週間後に全採血を行って抗血清を調製した。

【0028】(2) 酵素免疫測定法によるペプチド組成物抗体の検定(抗原性試験-1)

活性エステルで活性化されたキトバール(K-62、富士紡績)と本発明によるところのペプチド組成物とを混合して調製したペプチド組成物固定化担体と、(1)で調製したマウス抗血清とを37°Cで2時間反応させた後、洗浄し、山羊抗マウスIgG抗体の西洋ワサビバーオキシダーゼ(HRP)標識複合体(コスモバイオ)を2次反応させる。37°Cで1時間反応後、キトバール担体に結合して残っているHRP標識複合体の活性を測定する事によって、抗血清中に含まれているペプチド組成物に対する抗体の力値を検定した。本試験を行う事によって、本ペプチド組成物が生体に投与されたときに免疫系を刺激し、特異抗体を誘導し得るか否かを検定する。

【0029】(3) 受身皮膚アナフィラキシー(Passive Cutaneous Anaphylaxis:PCA)(抗原性試験-2)

滅菌生理食塩水を用い、一般に市販されているマウス抗牛・コラーゲン(type I)抗血清の1/2希釈系列(1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160)を作成し、各希釈血清50μlを背毛を刈った2匹のSD系ラット(オス、8週齢)の背部皮内に注射した。24時間後、このうちの1匹に、本発明によるところのペプチド組成物の1mgを含む0.6%エバンスブルー溶液1.0mlを尾静脈より注射した。また、ペプチド組成物に対する陽性コントロールとして、2匹目のSD系ラットにも同様に牛・コラーゲン(type I)の1mgを含む0.6%エバンスブルー溶液1.0mlを尾静脈より注射した。60分後2匹とも屠殺し、背部皮膚を剥いで紫斑を観察し、それらの大きさを測定した。判定は、紫斑径が10mm以上を(+)、9mm~5mmを(+)、4mm~1mmを(±)とし、紫斑が生じない場合を(-)とした。

【0030】(4) RAST-阻害試験(抗原性試験-3)

卵白、牛乳、大豆、米および小麦アレルギーの患者各10人づから採血された血清中のアレルゲン特異IgE抗体を測定するRAST試験法を実施する際に、本発明によるところのペプチド組成物によってRAST試験法で陽性となった患者の特異IgE抗体の力値が阻害されるか否かについて検討した。本試験を行う事によって、I型アレルギーを誘導するアレルゲン特異IgEと本ペプチド組成物が反応し得るかどうかについて検討する。

【0031】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は、本発明の範囲を何ら制限するものではない。

8

【0032】

【実施例1】

<Step 1>

変性コラーゲン(ゼラチン、宮城化学工業)50gを500mlの20mMHEPES緩衝液(pH7.0)に加温しながら溶解後、50°Cに冷却した。0.2gのコラゲナーゼ酵素(コスモバイオ、ABC Form III)を50mM HEPES緩衝液100mlに溶解した酵素溶液を、変性コラーゲン溶液にすばやく加えて強く搅拌した。両者の混合液30°C下、20時間加温した。この混合液は約1~2時間を経過する頃から粘性が低下し、約5~6時間経過するとほぼ完全に水溶液の状態となった。

<Step 2> Step 1で得られたコラゲナーゼ酵素による部分溶解液のpHを再調整した後、30°C下でさらに酵素分解を約18~20時間継続させた。この間、酵素反応液のpHを1時間毎にモニターしながら、反応液のpHを7.0に調整した。反応終了後、酵素分解溶液を2.0μmと次いで0.45μmのフィルターで沪過を行った。この沪液を初めに分画分子量5,000の限外沪過膜にアプライしてコラゲナーゼ酵素を除き、次いで分画分子量1,000の限外沪過膜にアプライして沪液を採取し、コラゲナーゼ酵素によるペプチド組成物とした。

【0033】

【実施例2】10mM PBS緩衝液(pH7.2)100mlにコラゲナーゼ酵素(和光純薬)5gを溶解させた酵素溶液に活性化キトバール(富士紡績)20mlを加え、4°Cで8時間振盪させてコラゲナーゼ酵素固定化担体を調製した。未結合酵素を沪過して除いた後、酵素固定化担体は緩衝液で十分に洗浄し、4°Cで保存した。使用時には、本酵素固定化担体を、カラムとカラムの間にpHセンサーを設置した3連式のカラムへ充填し、50mM HEPES緩衝液で良く洗浄・平衡化を行った。pHの測定は本3連式カラムのカラム間に設置したpHセンサーが変化を感じて、繋いであるチューブから濃厚HEPES緩衝液が流入するシステムとなっている。担体への結合量は結合前後の280nmにおける吸光度の変化を計測して算出した。

【0034】

【実施例3】

<Step 1> 変性コラーゲン(ゼラチン、宮城化学工業)50gを500mlの20mMHEPES緩衝液(pH7.0)に加温しながら溶解後、50°Cに冷却した。0.2gのコラゲナーゼ酵素(コスモバイオ、ABC Form III)を50mM HEPES緩衝液100mlに溶解した酵素溶液を、変性コラーゲン溶液にすばやく加えて強く搅拌した。両者の混合液は約1~2時間を経過する頃から粘性が低下し、約5~6時間経過するとほぼ完全に水溶液の状態となった。

<Step 2> Step 1で得られたコラゲナーゼ酵素による部

(6)

特開平7-82299

9

分溶解液のpHを7.0に再調整した後、実施例2で調製した縦型3連式のコラゲナーゼ酵素固定化カラムにアプライし、カラム法による酵素分解を行った。この間、流速は毎分5~8mLに、またカラムの温度は30±1°Cにコントロールした。最終(3連目)のカラムから出てきた酵素反応終了液を分取し、pHを7.0に再度調整した後、実施例1と同様の処理を行って、カラム法によるペプチド組成物とした。

【0035】

【実施例4】カルボキシ変性磁性粒子(日本ペイント)を蒸留水(pH 9.0, 1N NaOHで調製)に懸濁させ(1g/100mL)、一度洗浄したのち、同量(100mL)の50mM MES緩衝液に再懸濁させた。次いで、使用直前に同緩衝液に溶解させた100mg/mL水溶性カルボジイミド(東研化学、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)アビド)かホリビド-HCl:EDC)5mLを加え、室温下で30分間反応させた。冷却させたMES緩衝液100mLで3回洗浄を行った後100mLの5mM MES緩衝液に懸濁させ、これに50mM PB(pH 7.5)緩衝液に溶解させたコラゲナーゼ酵素12mg/mL(カムバ社、ABC Form III)10mLを添加してすばやく搅拌させ、室温下で2時間ロータリー式に回転させながら反応させた。未結合のコラゲナーゼ酵素は除去し、調製された酵素-磁性粒子結合体を洗浄後、50mM MES緩衝液100mLに再懸濁させ、防腐剤などを添加して使用するまで4°Cで保存した。

【0036】

【実施例5】

<Step 1>懸濁・石灰処理工程を経て、充分に中和・洗浄を行った牛骨オセイン(3/8インチ500g)を50mM HEPES緩衝液500mLに浸した。これに、実施例4で調製したコラゲナーゼ酵素-磁性粒子結合体20mLを加え、25~30°Cで24±1時間反応させた。反応終了液中の未消化原料を除くため粗い篩で沪過した後、磁石を用いて沪液から結合体を回収し、錦栓で再沪過を行った。

<Step 2>Step 1で得られたコラゲナーゼ酵素-磁性粒子結合体による部分溶解液のpHを調整した後、実施例2で調製した縦型3連式のコラゲナーゼ酵素固定化カラムにアプライし、カラム法による2段階目の酵素分解を行

った。この間、流速は毎分5~8mLに、またカラムの温度は30±1°Cにコントロールした。最終(3連目)のカラムから出てきた酵素反応終了液を分取し、pHを7.0に再度調整した後、実施例1と同様の処理を行って、カラム法によるペプチド組成物とした。

【0037】

【実施例6】

<Step 1>懸濁・石灰処理工程を経て、充分に中和・洗浄を行った牛骨オセイン(3/8インチ1000g)を50mM HEPES緩衝液1,000mLに浸した。これに、実施例4で調製したコラゲナーゼ酵素-磁性粒子結合体40mLを加え、25~30°Cで18±1時間ロータリー式に回転させながら反応させた。この間、反応液のpHをモニターして5N NaOHでpHを調製した。次いで、反応液から磁石を用いてコラゲナーゼ酵素-磁性粒子結合体を除いた後、ポアサイズ=0.2μmのセラミック性連続沪過システムに通して沪過液を分取した。

<Step 2>実施例2で調製されたコラゲナーゼ酵素固定化担体を充填した算盤式の分離型バイオリアクター(東京理化器械)を用いて、Step 1で得られた沪過液の2次酵素分解を行った。25~30°C前後で18~20時間の2次酵素分解を行った後、反応終了液を分画分子量1Kのメンブレンをセットした限外沪過装置にシステムに通した。この限外沪過メンブレンからは、分子量1K以下のコラゲナーゼ酵素による分解産物(ペプチド組成物)が得られた。なお、沪過されなかつた画分は保存し、次回の酵素分解材料として混合して用いた。

【0038】

30 【実施例7】実施例1、3、5、6で得られた、本発明によるところのペプチド組成物の分子量分布を高速液体クロマトグラフィー: HPLC(日本分光 UVIDEC-100V、カラム: GS-620)で測定した。各試料は、HPLCカラムヘインジェンションする前に0.2μmのメンブレンフィルターで沪過を行った。実施例1、3、5、6から得られた各ペプチド組成物の平均分子量値、分子量1,000以下のペプチドの割合および遊離アミノ酸の割合を表1にまとめた。

【0039】

40 【表1】

(7)

特開平7-82299

11

12

実施例	平均分子量 M. W.	≤1,000 のペプチド (%)	遊離アミノ酸 (%)
1	488	81.1%	5.6%
3	330	96.2%	2.5%
5	353	90.5%	1.9%
6	891	96.6%	1.3%

【0040】

【実施例8】実施例3において得られたペプチド組成物をエバボレーターで濃縮した後、逆相高速液体クロマト

*める主要な5画分を分取した。ついで、それぞれのNH₂末端のアミノ酸をアミノペプチダーゼ分解法で検定したところ、すべてのNH₂末端側のアミノ酸はグリシン

グラフィーにアプライし、全ペプチドの70%以上を占*20 であった。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 12 P 21/06

// A 61 K 38/00

A 61 L 15/16

27/00

識別記号

府内整理番号

9282-4B

ADA

Q

F I

技術表示箇所